

IDS 7



⑬ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 40 092 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
A 61 K 9/127
A 61 K 48/00
C 12 N 15/88

⑲ Aktenzeichen: 197 40 092.2
⑳ Anmeldetag: 12. 9. 97
㉑ Offenlegungstag: 18. 3. 99

DE 197 40 092 A 1

⑦① Anmelder:
Hengge, Ulrich, Dr.med., 45133 Essen, DE

⑦④ Vertreter:
BOEHMERT & BOEHMERT, 28209 Bremen

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
WO 97 10 851
WO 97 07 784
J. Controlled Release 1997, 43 (2,3) 251-9;
Skin Pharmacol. 1990, 3, 21-28;
Antimicrob. Agents Chemother. 1990,34(1)
S.107-10;
Clin. Invest. 1993, 71(8), 649-53;
Int. J. Pharm 1996, 127(1), 1-7;
Colloids Surf. A 1996, 113(3), 259-67;
J. Liposome Res., 1994, 4(1), 93-106;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ **Liposomen und Verfahren zur Transfektion von Zellen**

⑤⑦ Die Erfindung betrifft Liposomen umfassend eine Liposomenhülle ausbildende Lipidphase und eine von der Lipidphase umschlossene intraliposomale Phase, wobei die chemische Zusammensetzung der Lipidphase der einer Hautschicht entspricht und die intraliposomale Phase mindestens eine Verbindung enthält, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und niedermolekulare Verbindungen sowie aus diesen zusammengesetzte Moleküle oder Strukturen umfaßt, sowie ein Verfahren zur Herstellung derartiger Liposomen. Des weiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Transfektion von Zellen, wobei die zu transfizierenden Zellen mit den erfindungsgemäßen Liposomen in Kontakt gebracht werden. Des weiteren betrifft die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung und ein Mittel zur topischen Verabreichung, welche/welches einen Gehalt an den erfindungsgemäßen Liposomen aufweist sowie Verwendungen der erfindungsgemäßen Liposomen, der pharmazeutischen Zusammensetzung und des erfindungsgemäßen Mittels.

DE 197 40 092 A 1

- Die vorliegende Erfindung betrifft Liposomen umfassend eine eine Liposomenhülle ausbildende Lipidphase und eine von der Lipidphase umschlossene intraliposomale Phase, ein Verfahren zur deren Herstellung sowie daraus herstellbare Liposomen, Verfahren zur Transfektion von Zellen, Mittel zur topischen Verabreichung sowie Verwendungen der Liposomen und Mittel.

- Mit dem zunehmenden Verständnis biologischer Zusammenhänge auf molekularer Ebene etablierte sich in der jüngsten Vergangenheit die molekulare Medizin, die die Entwicklung neuer Therapiekonzepte und Medikamente maßgeblich beeinflusst. Dies gilt auch für die Haut, deren Funktion weit über die offensichtliche Barrierenfunktion hinausgeht und deren Erkrankungen in ganz besonderem Maße in vielen Fällen im wahrsten Sinne des Wortes offensichtlich sind.

- Eine Möglichkeit der Behandlung von Erkrankungen der Haut wird in der Insertion und Expression von Genen in der Epidermis gesehen, d. h. der Gentherapie der die Epidermis ausbildenden Zellen. Besonders bedeutsam sind hierbei die Keratinozyten.

- In der Technik sind verschiedene Verfahren bekannt, Keratinozyten in situ zu transfizieren. Eine Möglichkeit stellt die intradermale Injektion dar, bei es zur lokalen Transfektion, d. h. Expression des eingebrachten genetischen Materials in einem sehr eng umgrenzten dermalen Areal kommt. Typischerweise ist die Expression transient für 2 bis 7 Tage und es erfolgt keine Integration des applizierten genetischen Materials in das Genom der Keratinozyten. Ein entscheidender Nachteil dieser Technik besteht darin, daß eine entsprechende Transfektion auf den unmittelbaren Injektionsbereich beschränkt ist und es sich dabei um ein invasives Verfahren handelt, daß nur von qualifiziertem Personal unter geeigneten Hygienebedingungen zur Anwendung gelangen kann.

- Ebenfalls auf die lokale Applikation von Genmaterial beschränkt ist die Verwendung von Mikroprojektilen, die aus mit DNA beschichteten mikroskopischen Goldpartikeln bestehen und mittels einer sogenannten Genkanone direkt in die Zellen eingebracht werden. Auch dieses Verfahren ist mit einer Reihe von Nachteilen verbunden, die zum einen aus der Verwendung der vergleichsweise teuren Goldpartikel sowie dem erforderlichen Beschichtungsschritt resultieren, zum anderen jedoch auch in der Verwendung der Genkanone bestehen, die einen nicht unerheblichen apparativen Aufwand darstellt, ebenfalls qualifiziertes Personal zu seiner Bedienung benötigt und darüber hinaus nicht den gewünschten Erfolg liefert.

- Schließlich sind in der Technik noch topische Verfahren bekannt, bei denen komplexiert vorliegende DNA direkt in die die Epidermis aufbauenden Zellen eingebracht werden soll. So wurden beispielsweise kationische Lipide, die sich an die anionische DNA lagern, ebenso verwendet wie die Rezeptor-vermittelte Endozytose. Dabei blieb der erstgenannte Ansatz in der praktischen Anwendung erfolglos. Der zweite Ansatz, beispielsweise in Form der Transferrininfektion, ist aufgrund der immunogenen Bestandteile (es werden Dissoziationsproteine von Adenovirus oder des hämagglutinierenden Virus von Japan verwendet) immunogen und kann somit nur einige Male erfolgreich appliziert werden.

- Schließlich sind in der Technik noch die aus der Kosmetologie bekannten Liposomen beschrieben, die in der wäßrigen Innenphase die Plasmid-DNA enthalten. Auch dieser Ansatz führte nur bei einem kleinen Prozentsatz der Zellen zur erfolgreichen Transfektion.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Liposomen bereitzustellen, die eine hohe Transfektionsrate von Hautzellen, und insbesondere Keratinozyten, erlauben.

- Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung von Verfahren zur Herstellung von derartigen Liposomen. Schließlich liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Transfektion von Zellen, und insbesondere Keratinozyten, zur Verfügung zu stellen, welches eine hohe Transfektionsrate erlaubt.

Der Erfindung liegt auch die Aufgabe zugrunde, eine pharmazeutische Zusammensetzung bereitzustellen, die die gegenüber dem Stand der Technik verbesserte Applikation von Wirkstoffen, insbesondere die topische Applikation derselben, erlaubt.

- Weiterhin liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, Mittel zur topischen Verabreichung chemischer Verbindungen bereitzustellen.

Des weiteren sollen erfindungsgemäß Mittel zur Gentherapie von Hautzellen, zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Erkrankungen der Haut, einschließlich von Warzen, von systemischen Erkrankungen und von Alopezie sowie Mittel zur Immunisierung offenbart werden.

- Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch Liposomen umfassend eine eine Liposomenhülle ausbildende Lipidphase und eine von der Lipidphase umschlossene intraliposomale Phase, wobei die chemische Zusammensetzung der Lipidphase der einer Hautschicht entspricht und die intraliposomale Phase mindestens eine Verbindung enthält, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und niedermolekulare Verbindungen sowie aus diesen zusammengesetzte Moleküle oder Strukturen umfaßt.

- Die Aufgabe wird auch gelöst durch Liposomen umfassend eine eine Liposomenhülle ausbildende Lipidphase und eine eine von der Lipidphase umschlossene intraliposomale Phase, wobei das Liposom betreffend der Lipidklassen folgende Komponenten umfaßt:

Phospholipide	< 2 Gew.-%
Cholesterolsulfat	2 Gew.-%
Freie Fettsäuren	20 Gew.-%
Ceramide	20 Gew.-%
Sterole	43 Gew.-%
Triacylglycerole (Neutralfette)	4 Gew.-%
Sterolester	9 Gew.-%

und die intraliposomale Phase mindestens eine Verbindung enthält, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und niedermolekulare Verbindungen sowie aus diesen zusammengesetzte Moleküle

oder Strukturen umfaßt.

Weiterhin wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren, wobei vorgesehen ist, daß a) Stratum corneum-Lipid gewonnen wird und b) aus dem Stratum corneum-Lipid unter Ultraschallbehandlung und/oder Detergenz-dialyse Liposomen hergestellt werden.

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch Liposomen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren herstellbar sind.

Desweiteren wird die Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Transfektion von Zellen gelöst, wobei die zu transfizierenden Zellen mit den erfindungsgemäßen Liposomen in Kontakt gebracht werden.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe auch durch eine pharmazeutische Zusammensetzung gelöst, die die erfindungsgemäßen Liposomen und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfaßt.

Desweiteren wird die Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Mittel zur topischen Verabreichung chemischer Verbindungen gelöst, wobei das Mittel einen Gehalt an erfindungsgemäßen Liposomen aufweist.

Schließlich wird die Aufgabe gelöst durch Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen, der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung oder des erfindungsgemäßen Mittels zur Genterapie von Hautzellen.

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen, der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung oder des erfindungsgemäßen Mittels zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Erkrankungen der Haut, einschließlich der Behandlung von Warzen, systematischen Erkrankungen und von Alopezie sowie Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen, der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung oder des erfindungsgemäßen Mittels zur Immunisierung eines Wirtsorganismus.

Auch wird die Aufgabe gelöst durch einen Impfstoff, der einen Gehalt an den erfindungsgemäßen Liposomen aufweist, wobei die Liposomen Nukleinsäure, die die genetische Information für ein interessierendes Antigen umfaßt, oder Nukleinsäure umfassen, die die genetische Information für einen Antikörper oder ein Antikörperfragment umfaßt, wobei der Antikörper bzw. das Antikörperfragment spezifisch für das interessierende Antigen ist.

Bei dem eine Liposomenhülle ausbildende Lipidphase und eine von der Lipidphase umschlossene intraliposomale Phase umfassenden Liposom bei dem die chemische Zusammensetzung der Lipidphase der einer Hautschicht entspricht, kann vorgesehen sein, daß die Hautschicht humane Epidermis ist.

In einer weiteren Ausführungsform kann vorgesehen sein, daß die Hautschicht das Stratum corneum ist.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Liposomen kann vorgesehen sein, daß Stratum corneum-Lipid gewonnen wird, indem Stratum corneum enzymatisch und/oder mechanisch von der Haut abgetragen wird und anschließend in Methanol/Chloroform extrahiert wird.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Liposoms kann vorgesehen sein, daß die intraliposomale Phase eine wäßrige Phase ist.

Desweiteren kann vorgesehen sein, daß die intraliposomale Phase mindestens eine chemische Verbindung enthält, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und niedermolekulare Verbindungen sowie aus diesen zusammengesetzte Moleküle oder Strukturen umfaßt.

Darüber hinaus kann vorgesehen sein, daß die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, die Wachstumsfaktoren, Antibiotika, schmerz/lindernde Agenzien, Agenzien, die die Zellteilung und/oder die Vaskularisierung beeinflussen, koagulierende und anti-koagulierende Agenzien, Cytokine, chemisches Attraktans, Enzyme, und Kombinationen davon umfaßt.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist die chemische Verbindung eine Nukleinsäuresequenz.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Transfektion von Zellen kann vorgesehen sein, daß die zu transfizierenden Zellen Hautzellen sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Hautzellen ausgewählt aus der Gruppe, die Hautzellen des Stratum corneum, Stratum granulosum und Stratum spinosum sowie Keratinozyten umfaßt.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Zellen im erfindungsgemäßen Verfahren zur Transfektion Keratinozyten der Haarfollikel sind.

In anderen, ganz besonders bevorzugten Ausführungsform sind die Zellen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Transfektion epidermale Langerhans-Zellen.

Bei dem erfindungsgemäßen Mittel zur topischen Verabreichung chemischer Verbindungen kann vorgesehen sein, daß das Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe, die Cremes, Salben, Gele, Sprühpflaster und Tinkturen umfaßt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mittels ist vorgesehen, daß das Mittel weiterhin einen Gehalt an mindestens einer Verbindung aufweist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Permeabilitätsverstärker und Quellmittel umfaßt.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung der hierin offenbarten Liposomen, der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Mittels zur Genterapie von Hautzellen kann vorgesehen sein, daß die Hautzellen in situ vorliegen.

In einer alternativen Ausführungsform der obigen erfindungsgemäßen Verwendung kann vorgesehen sein, daß die Hautzellen ex vivo vorliegen.

Weiterhin kann bei der vorgenannten Verwendung vorgesehen sein, daß die Hautzellen ausgewählt sind aus der Gruppe, die Hautzellen des Stratum corneum, Stratum granulosum und Stratum spinosum sowie Keratinozyten umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Hautzellen Keratinozyten der Haarfollikel sind.

Weiterhin kann in einer Ausführungsform der obigen erfindungsgemäßen Verwendung vorgesehen sein, daß die Hautzellen epidermale Langerhans-Zellen sind.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung der hierin offenbarten Liposomen, der hierin offenbarten pharmazeutischen Zusammensetzung oder des hierin offenbarten Mittels zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Erkrankungen der Haut ist in einer bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, daß die Erkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die genetische Hauterkrankungen, Psoriasis, Hauttumoren und Wunden umfaßt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, daß die genetische Hauterkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die Epidermolysis bullosa simplex, Epidermolysis hyperkeratosis, palmoplantare Keratose, junctionale Epidermolysis bullosa, dystrophe Epidermolysis bullosa, lamellare Ichthyose und Xeroderma pigmentosum umfaßt.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung der hierin offenbarten Liposomen, der hierin offenbarten pharmazeutischen Zusammensetzung oder des hierin offenbarten Mittels zur Behandlung systemischer Erkrankungen ist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, daß die systemische Erkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die Hämophilie A und Hämophilie B sowie Kollagen Degeneration umfaßt.

- 5 Bei der erfindungsgemäßen Verwendung der hierin offenbarten Liposomen, der hierin offenbarten pharmazeutischen Zusammensetzung oder des hierin offenbarten Mittels zur Immunisierung eines Wirtsorganismus ist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, daß der Wirtsorganismus ein menschlicher Organismus ist.

Der vorliegenden Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zugrunde, daß mit den erfindungsgemäßen Liposomen eine besonders hohe Transfektionsrate von Hautzellen, und insbesondere von Keratinozyten, erreicht werden kann. Dieser Effekt scheint durch den hohen Grad an Hydrophobizität der Liposomenhülle, d. h. deren Lipidzusammensetzung, bedingt zu sein. DNA, die in den erfindungsgemäßen Liposomen enkapsuliert vorliegt, kann die epidermale Barriere der Haut überwinden und in den tieferen Schichten der Epidermis aufgenommen und exprimiert werden.

- Die vorgehend beschriebene Passagiefähigkeit der erfindungsgemäßen Liposomen erlaubt darüberhinaus auch eine Freisetzung von in den Liposomen enthaltenen Verbindungen oder Wirkstoffen, einschließlich Nukleinsäuren, in tieferen Schichten der Epidermis bzw. der Haut, was sowohl unter dem Aspekt der Verabreichung pharmazeutisch wirksamer Verbindungen wie auch unter dem Aspekt der kosmetischen Behandlung der Haut von Vorteil ist.

- Dabei ist ganz besonders beachtlich, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen bzw. der hierin offenbarten Mittel und Verfahren die Nukleinsäure-Applikation mehrmals wiederholbar ist und es nicht zum Auftreten einer Immunantwort, insbesondere einer solchen gegen nackte Nukleinsäure gerichtet, kommt, was gegenüber anderen Transfektionstechniken einen erheblichen Vorteil darstellt.

Infolge der hohen Transfektionsrate wird es erstmalig möglich, einfach und zuverlässig viele Hautzellen zu transfizieren und somit die Grundlage dafür zu legen, die der Gentherapie der Haut inhärenten Vorteile tatsächlich zu realisieren.

- Diese Vorteile bestehen unter anderem darin, daß, neben einer in der Regel kausalen Therapie, das die therapierten Zellen aufweisende Gewebe im Falle unerwünschter Nebenwirkungen leicht entfernt werden kann und weiterhin infolge der Tatsache, daß eine ektopische Expression der mittels der erfindungsgemäßen Liposomen eingeschleusten Nukleinsäure ausgeschlossen werden kann, die Therapie als solche jederzeit unterbrochen werden kann.

Darüber hinaus sind insbesondere die Keratinozyten vergleichsweise leicht zu gewinnen sowie in Kultur zu expandieren und es sind in der Technik auch Verfahren und Mittel bekannt zur Modulation der Expression einer in Keratinozyten vorhandenen Nukleinsäuresequenz.

- Die intraliposomale Phase kann eine wäßrige Phase sein, wobei vorgesehen sein kann, daß diese ein spezielles Milieu, gestaltet durch den Zusatz bestimmter Verbindungen, aufweist. Die wäßrige Phase kann so beispielsweise einen distinkten pH-Wert, einen bestimmten Puffer, oder Ionenkonzentrationen aufweisen, die die Stabilität, Konformation und biologische Wirksamkeit der darin enthaltenen - chemischen - Verbindungen beeinflussen und somit für den Fall, daß in der intraliposomalen Phase ein zur Transfektion geeignetes Nukleinsäurekonstrukt vorhanden ist, auf die Transfektionsrate der mit den erfindungsgemäßen Liposomen behandelten Zellen einwirken. Die Gestaltung eines entsprechenden Milieus, um die genannten Effekte zu erreichen, sind den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt.

Bei den in der intraliposomalen Phase enthaltenen chemischen Verbindungen handelt es sich um solche, bei denen eine chemische Bindung zwischen mindestens zwei Atomen besteht und umfassen entsprechend auch biochemische bzw. biologische Verbindungen.

- Unter niedermolekulare Verbindungen sollen hierin solche verstanden werden, die ein Molekulargewicht von weniger als 10 000 aufweisen und insbesondere solche, die Kohlenstoff enthalten. Derartige Verbindungen sollen auch Carbonsäuren, Aminosäuren, Kohlenhydratmonomere, Lipide, einschließlich Steroide, Lactame, Lactone und andere einschließen. Unter Proteinen sollen hierin auch Peptide und allgemein Polymere von mindestens zwei peptidisch miteinander verbundenen Aminosäuren verstanden werden.

- Unter Nukleinsäure bzw. Nukleinsäuresequenz sollen hierin sowohl DNA als auch RNA verstanden werden. Die Nukleinsäure(-Sequenz) kann sowohl nackt als auch komplexiert/assoziiert vorliegen. Desweiteren ist möglich, daß die Nukleinsäure(-Sequenz) als Einzelstrang, Doppelstrang oder als Triplett vorliegt. Die Nukleinsäuresequenz kann auch ein Ribozym sein oder eine antisense Nukleinsäure. Desweiteren kann sie sowohl natürlich vorkommend sein als auch rekombinant. Die Nukleinsäure(-Sequenz) kann weitergehende Elemente umfassen, die sowohl ihre Transkription als auch Translation und ihre Stabilität beeinflussen. So kann sie beispielsweise Promotoren, zellspezifische ebenso wie induzierbare, Terminatoren und weitergehende regulatorische Elemente wie beispielsweise Enhancer umfassen. Schließlich kann die Nukleinsäure(-Sequenz) auch Elemente umfassen, die die Insertion der Nukleinsäure(-Sequenz) in das Chromosom einer transfizierten Zelle erlauben, oder aber auch Elemente, die verhindern, daß es zu einer Insertion der Nukleinsäure(-Sequenz) in das zelluläre Genom kommt. Letzteres kann beispielsweise dann besonders erwünscht sein, wenn lediglich eine transiente Expression der transfizierten Nukleinsäure(-Sequenz) erwünscht ist.

- Grundsätzlich kann die Nukleinsäure(-Sequenz) so gestaltet vorliegen, daß sowohl auf der RNA-Ebene als auch der Translations- und Transfektions-Ebene die erwünschte Wirkung erzielt wird. Die hierzu in der Nukleinsäure(-Sequenz) selbst vorzunehmenden Maßnahmen bzw. die Gestaltung eines Milieus, innerhalb dessen die Nukleinsäure(-Sequenz) die entsprechenden Eigenschaften oder Wirkungen aufweist, wie beispielsweise eine spezielle Konfiguration wie die Z-Konfiguration, sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt.

Unter Nukleinsäure sollen hierin auch Oligonukleotide verstanden werden, einschließlich antisense-Oligonukleotide zur Steuerung der Transkription und/oder Translation von in Zellen vorhandenen Nukleinsäuresequenzen.

Die Transfektion von Zellen mittels Liposomen ist dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt.

- Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Transfektion von Zellen ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen sowohl für den Fall von Vorteil, daß die Zellen, ausgewählt aus der Gruppe, die Hautzellen des Stratum corneum, Stratum granulosum und Stratum spinosum sowie Keratinozyten umfaßt, bzw. Keratinozyten der Haarfollikel bzw. epidermale Langerhans-Zellen, in vivo als auch für den Fall, daß die vorgenannten Zellen ex vivo transfiziert werden.

Aus dem oben Gesagten ergibt sich, daß die den erfindungsgemäßen Liposomen inhärenten Vorteile auch und beson-

ders dann realisiert werden können, wenn diese in einer pharmazeutischen Zusammensetzung enthalten sind.

Es wurde überraschend gefunden, daß unter Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen sich allgemein pharmazeutische Zusammensetzungen und insbesondere Mittel zur topischen Verabreichung chemischer Verbindungen herstellen lassen, die in besonders effektiver Weise eine Freisetzung der in der intraliposomalen Phase enthaltenen chemischen Verbindungen in die Zelle bzw. die tieferen Schichten der Epidermis und der Dermis ermöglichen. In einem weiteren Aspekt wird darüber hinaus auch möglich, eine spezielle Form der Depotverabreichung der in den Liposomen enthaltenen chemischen Verbindungen zu realisieren.

Unter pharmazeutisch akzeptablem Träger werden, unter anderem, Wasser, Pufferlösungen und dergleichen verstanden. Dies schließt hierin insbesondere auch jene den Fachleuten bekannten Träger ein, die bei der Herstellung topischer Applikationsformen wie Cremes, Salben, Gele, Sprühpflaster und Tinkturen verwendet werden.

Unter chemischen Verbindungen sollen die hierin oben definierten Verbindungen verstanden werden und schließen insbesondere die dort, wenngleich nicht abschließend, beschriebenen Nukleinsäuren ein.

Die hierin offenbarten Mittel stellen letztendlich Ausführungsformen der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung dar.

Sowohl die hierin beschriebene pharmazeutische Zusammensetzung als auch die Mittel zur topischen Verabreichung können darüber hinaus noch mindestens einen Wirkstoff enthalten, der nicht in den darin enthaltenen Liposomen vorliegt.

Das Mittel zur topischen Verabreichung selbst kann dabei ausgebildet sein als Creme, Salbe, Gel, Sprühpflaster oder Tinktur. Diese Mittel erlauben die Aufnahme der erfindungsgemäßen Liposomen in eine Matrix, die dann, typischerweise auf die Haut, aufgetragen wird und ggf. nach einer Einwirkzeit den Kontakt zwischen Zelle und Liposom ermöglicht. Durch die Verteilung der Liposomen in besagter Matrix läßt sich somit statistisch auch die Transfektionshäufigkeit einer einzelnen Zelle regulieren.

Die obengenannten topischen Verabreichungsformen erlauben darüber hinaus, daß ein vergleichsweise großes Areal der Haut entsprechend behandelt wird, d. h. wenn in der intraliposomalen Phase Nukleinsäuresequenzen vorhanden sind, ein großes Areal von Hautzellen transfiziert werden kann. Die Transfektion, insbesondere in ihrer klinischen Anwendung, ist dann besonders einfach durchführbar, ohne daß hierfür besonders qualifiziertes Personal oder besondere hygienische Bedingungen erforderlich wären.

Die erfindungsgemäßen Mittel können hinsichtlich ihrer Wirksamkeit, Handhabbarkeit und Stabilität durch Modifikation der die Matrix derselben ausbildenden Verbindungen in für den Fachmann auf diesem Gebiet bekannten Art und Weise ausgebildet werden. Dies schließt den Zusatz weiterer, für die Ausbildung von Cremes, Salben, Gelen, Sprühpflastern und Tinkturen üblichen Zusätzen ein.

Sowohl die Liposomen als solche als auch die sie enthaltenden erfindungsgemäßen Mittel sind besonders vorteilhaft in der Gentherapie von Hautzellen aufgrund der durch sie erreichbaren Transfektionsraten zu verwenden. Dabei ist es möglich, daß die entsprechenden Hautzellen, und insbesondere die humanen Keratinozyten, einschließlich derjenigen der Haarfollikel, sowie die epidermalen Langerhans-Zellen, in situ, d. h. als Teil der Hautoberfläche des Patienten, vorliegen, aber es ist auch eine ex vivo Gentherapie möglich, wenn die Hautzellen oder Hautgewebe, und auch hier wiederum speziell die humanen Keratinozyten, einschließlich derjenigen der Haarfollikel, sowie die epidermalen Langerhans-Zellen, in Kultur vorliegen. Es ist offensichtlich, daß bei der in situ Situation das erfindungsgemäße Mittel mit einem Gehalt an Nukleinsäure in der intraliposomalen Phase mit besonderen Vorteilen verbunden ist, wohingegen im Falle der ex vivo Gentherapie insbesondere die erfindungsgemäßen Liposomen die hierin offenbarten Vorteile im besonderen Maße aufweisen.

Insbesondere bei transienter Genexpression der mittels der erfindungsgemäßen Liposomen in die Hautzellen eingebrachten Nukleinsäure(-Sequenzen) ist eine einfache Wiederholung der Therapie sowie leichte Steuerung der Therapieumfanges durch eine entsprechende breitflächige topische Applikation des erfindungsgemäßen Mittels problemlos möglich. Insbesondere unter dem Aspekt der wiederholten Behandlung ist dabei beachtlich, daß gegen die solchermaßen in das biologische System, beispielsweise die menschliche Haut, eingebrachte Nukleinsäure keine gegen diese gerichtete Immunreaktion festgestellt wird.

Bei der Anwendung der erfindungsgemäßen Liposomen, des erfindungsgemäßen Mittels oder der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung zur Gentherapie von Hautzellen, und speziell von Keratinozyten, einschließlich derjenigen der Haarfollikel, sowie von Langerhans-Zellen, ist dabei grundsätzlich möglich, durch die eingeschleusten Nukleinsäuresequenzen eine einen Defekt der transfizierten Zelle komplementierende Wirkung zu erzielen, oder aber die unerwünschte Expression einer in der Zelle vorhandenen genetischen Information mittels der durch die Liposomen eingeführten Nukleinsäuresequenz zu unterdrücken.

Die letztgenannte Möglichkeit gilt auch für den Fall, daß die erfindungsgemäßen Liposomen bzw. das erfindungsgemäße Mittel bei der Behandlung systemischer Erkrankungen verwendet wird. Dabei kommt es infolge der Liposomenvermittelten Transfektion der Hautzellen zur Produktion des durch die in die Zelle eingeschleusten Nukleinsäuresequenz kodierten Genproduktes, das dann seinerseits seine biologische Wirkung entfalten kann. Dabei ist es möglich, daß das entsprechende Genprodukt aus der gefäßlosen Epidermis an den Blutkreislauf abgegeben und somit systemisch zur Verfügung steht. Gegenüber der Verabreichung entsprechender Proteine oder Peptide erlaubt die Gentherapie von Hautzellen, daß die entsprechende Information transient, typischerweise über einen Bereich von 2 bis 7 Tagen, kontinuierlich in hoher lokaler Gewebekonzentration exprimiert wird und gewährleistet somit gegenüber der Verabreichung des Peptids bzw. Proteins als solchem einen länger anhaltenden konstanten Titer, da das Protein als solches nur eine geringe biologische Halbwertszeit aufweist.

Neben der Behandlung echter systemischer Erkrankungen wie beispielsweise Hämophilie A und Hämophilie B sind auch Kollagendegenerationen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen oder des erfindungsgemäßen Mittels, ggf. kosmetisch, behandelbar.

Unter Kollagendegenerationen sollen hierin auch Lichtdermatosen verstanden werden, bei denen es unter UV-Exposition zur Degeneration von Kollagen (und Elastin) und somit zur Faltenbildung kommt. Hier ermöglicht die hierin of-

fenhafte Gentherapie von Hautzellen bzw. die erfindungsgemäßen Liposomen oder das erfindungsgemäße Mittel vorteilhafte Wirkungen, da infolge des transienten Charakters der Gentherapie der Keratinozyten eine Reversibilität der vorgenannten Maßnahmen gegeben ist. Die sich daraus ergebenden Vorteile, insbesondere in der Kosmetik, sind offensichtlich. So ist beispielsweise an eine erneute Kollagen- und Elastinproduktion durch die gentherapierten Hautzellen denkbar, mit der Folge, daß diese für die Haut, insbesondere deren Aussehen, so wichtigen Strukturstoffe endogen gebildet werden können.

Bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen zur Behandlung von Warzen liegt das Prinzip wiederum in der gentherapeutischen Behandlung der die Warze ausbildenden Hautzellen, welche typischerweise mit viraler DNA infiziert sind. Entsprechend können durch die Liposomen die vorgenannten Zellen transiziert werden und auf molekularer Ebene das zur Warzenbildung führende Geschehen letztendlich unterdrückt werden. Besonders bewährt hat sich hierbei die Interferon- α -Plasmid-Expression in Warzen, die durch hohe intraläsionale Spiegel an Interferon- α -Protein zum kompletten Rückgang der Papillom führt.

Der Behandlung von Alopezie unter Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen liegt ebenfalls das Prinzip zugrunde, daß letztendlich durch gentherapeutische Veränderung des Gen- und Phänotyps der Haarfollikelzellen bzw. der entsprechenden Keratinozyten das Krankheitsbild abgestellt, zumindest aber vermindert werden kann. Entsprechende Expression von Antagonisten der Androgen-Rezeptoren sowie von im Haarwachstumszyklus relevanten Cytokinen (z. B. TGF, Transforming Growth Factor; EGF, Epidermal Growth Factor) stellen wesentliche Ansatzpunkte einer solchen Technologie dar.

Von ganz besonderer Bedeutung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen bei der Immunisierung eines Wirtsorganismus, wobei hierin unter Wirtsorganismus insbesondere Säugetiere, darunter Nutz- und Haustiere sowie Zoofiere, wie Rind, Schwein, Pferde, Hunde, Katzen, Ratten, Mäuse, Affen und Geflügel verstanden werden sollen. Letztendlich können die erfindungsgemäßen Liposomen in all jenen animalischen Systemen zur Anwendung gelangen, in denen Langerhans-Zellen vorhanden sind, insbesondere jene in der Haut vorhandenen, die in der Lage sind, Antigen zu präsentieren. So kann, beispielsweise bei topischer Auftragung einer die erfindungsgemäßen Liposomen enthaltenden topischen Applikationsform, wie beispielsweise einer Creme, eine Transfektion der Langerhans-Zellen mit in der intraliposomalen Phase enthaltenen Nukleinsäure erfolgen, mit der Wirkung, daß das durch die besagte Nukleinsäure kodierte Antigen in den Langerhans-Zellen exprimiert sowie von diesen zur Stimulierung der Immunantwort an der Zelloberfläche präsentiert wird.

Somit besteht eine wirksame Möglichkeit, einen Wirtsorganismus gegen ein jegliches Antigen zu immunisieren, das durch eine Nukleinsäure direkt oder indirekt kodiert und durch Langerhans-Zellen an der Zelloberfläche präsentiert werden kann.

Ein solches Antigen, gegen das im Wirtsorganismus eine Immunantwort erzeugt werden soll, wird hierin als interessantes Antigen bezeichnet.

Eine derartige Immunisierung ist dabei nicht nur auf die Präsentation von Antigen durch die Langerhans-Zellen beschränkt, was einer aktiven Immunisierung gleichkommt, sondern ermöglicht auch eine passive Immunisierung der Gestalt, daß entsprechende Antikörper bzw. Fragmente davon, die für ein interessantes Antigen spezifisch sind, durch mit den erfindungsgemäßen Liposomen, die eine für den Antikörper bzw. ein Fragment davon kodierende Nukleinsäure enthalten, transizierte Hautzellen exprimiert und an den Blutkreislauf gegeben werden können, ähnlich wie bei der oben beschriebenen Therapie systemischer Erkrankungen.

Unter Antikörper sollen hierin auch Antikörperderivate verstanden werden, so z. B. auch solche nur aus einer Kette bestehende, trunkierte oder aufgrund der Spezifität des interessierenden Antigens speziell hinsichtlich ihrer Bindungsstelle konstruierte entsprechende Moleküle. Derartige Antikörper sowie deren Derivate und andere sind dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt.

Die vorgenannte Immunisierung, insbesondere wenn diese durch Verwendung einer topischen Applikationsform bedingt wird, weist ganz besondere Vorteile der Gestalt auf, daß sie ausgesprochen leicht durchführbar ist in dem Sinne, daß kein qualifiziertes Personal benötigt wird und insbesondere hygienisch in bestimmten Lagen bedenkliche Injektionen vermieden werden. Darüber hinaus ergeben sich Vorteile hinsichtlich der Haltbarkeit eines die erfindungsgemäße Liposomen umfassenden Impfstoffes, welcher durch die erfindungsgemäßen Liposomen, die pharmazeutische Zusammensetzung oder die erfindungsgemäßen Mittel dargestellt wird. Diese erhöhte Haltbarkeit wird im wesentlichen dadurch bedingt, daß nicht irgendwelches proteinhaltiges Material, sei es nun das Antigen bei der aktiven Immunisierung oder der Antikörper oder das Antikörperfragment bei der passiven Immunisierung, noch dazu in für die Injektion geeigneter Weise, vorliegen muß.

Aus der Tatsache, daß der Impfstoff im engeren Sinne erst durch die Langerhans-Zellen gebildet und letztendlich präsentiert wird, bedingt auch einen erheblichen Kostenvorteil, da auf eine Produktion von proteinhaltigem Material mit anschließender Aufreinigung verzichtet werden kann.

Aus dem im folgenden angeführten Beispiel betreffend die Herstellung der erfindungsgemäßen Liposomen werden weitere Vorteile und Merkmale der Erfindung offenbart, wobei

Fig. 1 eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gefrierbruchs (ITEM) von menschlichen Stratum corneum-Lipid-Liposomen bei Präparation durch Detergenzdialyse zeigt,

Fig. 2 eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gefrierbruchs (FFEM) von menschlichen Stratum corneum-Lipid-Liposomen, hergestellt durch Ultraschallbehandlung, zeigt,

Fig. 3 eine Nicomp Größenverteilungsanalyse von Stratum corneum-Lipid-Liposomen, hergestellt durch Ultraschallbehandlung, mit inverser Laplace-Transformation (bimodale Verteilung) zeigt,

Fig. 4 eine Nicomp Größenverteilungsanalyse von Stratum corneum-Lipid-Liposomen, hergestellt durch Detergenzdialyse, mit inverser Laplace-Transformation (bimodale Verteilung) zeigt

Fig. 5 die Zeta-Potentialverteilung der durch Ultraschallbehandlung hergestellten Stratum corneum-Lipid-Liposomen darstellt und

Fig. 6 das Ergebnis der Transfektion humaner Haut mittels Plasmid-DNA enthaltenden erfindungsgemäßen Liposo-

men zeigt.

Beispiel 1

Herstellen der erfindungsgemäßen Liposomen

Gewinnung des stratum corneum-Lipids

Aus kleinen, bei chirurgischen Eingriffen anfallenden Hautstücken wurde die Hornschicht enzymatisch mittels Trypsinierung gewonnen und das Gesamtlipid nach einer modifizierten Bligh & Dyer-Methode extrahiert [Lasch, J.: J. Liposome Res. 4 (1), 93-106 (1994)]. Alternativ wurde abgeschabte plantare Hornhaut verwendet.

Die Proben wurden im Dunkeln mit Chloroform/Methanol (1:1) bei kräftigem Schütteln in einer Stickstoffatmosphäre extrahiert. Ein Drittel des Volumens wurde als PBS-Puffer zugesetzt, um Cholesterolsulfat in die organische Phase durch NaCl "auszusalzen". Die Mischung wurde gevortext und die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die untere organische Phase wurde gesammelt und unter N₂ getrocknet.

Die Lipidzusammensetzung des plantaren Stratum corneum wurde durch Messung der Flächen unter den Reflexionsabsorptionskurven nach Trennung durch HPTLC [(Automated Multiple Development HPTLC von CAMAG; Muttenz, Schweiz); Zellmer, S.; Journal of Chromatography B, 691 (1997), 321-329] und Kalibrierung mit dem jeweiligen Lipid an mehr als 100 Probanden quantifiziert. Die Anfärbung erfolgt mittels CuSO₄/H₃PO₄ in 5%igem Methanol.

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die verschiedenen Lipidklassen entsprechend ihrem prozentualen Anteil (Mittelwerte) angegeben:

Tabelle 1

Mittelwerte der verschiedenen das Stratum corneum-Lipid ausbildenden Lipidklasse, angegeben in Gewichtsprozenten

Lipidklasse	Mittelwert Lipid (Gewichtsprocente)
Phospholipide	< 2
Cholesterolsulfat	2,06 +/- 0,13
Freie Fettsäuren	20,16 +/- 1,12
Ceramide	20,25 +/- 0,67
Sterole	43,53 +/- 3,04
Triacylglycerole (Neutralfette)	4,56 +/- 0,54
Sterolester	9,44 +/- 0,67

Herstellung von menschlichen Stratum corneum-Lipid-Liposomen (hSCLs)

hSCLs wurden zum einen durch Ultraschall hergestellt, indem eine Lipiddispersion in PBS, pH 7,4, im Branson Sonifier bis zur Transparenz beschallt wurde, wobei die Beschallung in Intervallen von 0,5 min unter Eiswasserkühlung erfolgte.

Alternativ wurden mit der sogenannten Detergenzverdünnungsmethode hSCLs hergestellt. Speziell wurden Cholat-Lipid-Mischmizellen in einem speziellen Rotationsdialysator (Diachem AG, Lagnau/Zürich) in Lipidvesikel überführt.

Die Ergebnisse beider Verfahren sind in den Fig. 1 und 2 dargestellt, wobei Fig. 1 eine elektronenmikroskopische Aufnahme (FFEM) eines Gefrierbruches von hSCLs zeigt, die durch Detergenzdialyse hergestellt wurden, und in Fig. 2 eine elektronenmikroskopische Aufnahme (FFEM) eines Gefrierbruches von hSCLs zeigt, die durch Ultraschall

hergestellt wurden.

In beiden Fällen repräsentiert der dargestellte Balken 100 nm und die eingekreisten Pfeile die Bedampfungsrichtung. Die hSCLLS wurden weitergehend hinsichtlich ihrer Größenverteilung durch Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) mit einem Nicomp Submicron Particle Sizer, Model 370, charakterisiert. Die entsprechenden Ergebnisse sind in den Fig. 3 und 4 dargestellt, wobei Fig. 3 die Ergebnisse der durch Beschallung hergestellten Liposomen und Fig. 4 die durch Detergenzdialyse hergestellten Liposomen zeigt.

Aus Fig. 3 ist ersichtlich, daß 74,62% der Liposomen einen Durchmesser von 160,6 nm aufweisen, wobei eine zweite, bedeutend kleinere Fraktion, die 25,38% der Liposomen ausmacht, einen Durchmesser von 416,7 nm aufweist.

Bei der Herstellung der Liposomen mittels Detergenzdialyse sind, wie aus Fig. 4 ersichtlich, ebenfalls zwei Populationen von Liposomen hervorgegangen, wobei 87,3% der Liposomen einen Durchmesser von 183,5 nm aufweisen, gegenüber einer zweiten, wenngleich mit 12,7% deutlich geringeren Population, die einen Durchmesser von 979,7 nm aufweist.

In beiden Fällen wurden die vorgenannten Daten aus den Primärdaten unter den folgenden Bedingungen erhalten: Glättungsfaktor 3, minimaler Durchmesser 80 nm, plot size 39, gesammelte Impulse 8000 K in 30 Min., Zählrate 300 Hz.

In Fig. 5 ist die Bestimmung des Zeta-Potentials der hSCLLS dargestellt, die mit der Zeta Master Version PCS v1.2 (Malvern Instruments, England) im Zelltyp ZEMO10 Cross Beam Mode bestimmt wurde (Lasch, J.: J. Liposome Res. 5(1), 99-108 (1995)).

Wie aus Fig. 5 ersichtlich, beträgt das Zeta-Potential der hSCLLS -64 bis -66 mV. Dieser relativ hohe negative Wert kann auf den Gehalt an Cholesterolsulfat zurückgeführt werden.

Die einzelnen, verschiedenen Zetapotentialen entsprechenden Intensitäten sind nochmals in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Zetapotentialverteilung (mV) von durch Beschallung hergestellten hSCLLS

Zeta	Inten- sität	Zeta	Inten- sität	Zeta	Inten- sität
-150,0	0,0	-83,3	0,0	-16,7	0,0
-141,7	0,0	-75,0	24,2	-8,3	0,0
-133,3	0,0	-66,7	44,8	0,0	0,0
-125,0	0,0	-58,3	31,0	8,3	0,0
-116,7	0,0	-50,0	0,0	16,7	0,0
-108,3	0,0	-41,7	0,0	25,0	0,0
-100,0	0,0	-33,3	0,0	33,3	0,0
-91,7	0,0	-25,0	0,0	41,7	0,0

Andere Verfahren zur Kennzeichnung der die Liposomenhülle ausbildenden Lipidschicht, wie beispielsweise die Messung der Phasenübergangstemperatur (T_m) ergab keine Ergebnisse, was durch den hohen Gehalt an Cholesterol im Stratum corneum-Lipid bedingt wird.

Beispiel 2

Transfektion humaner Haut mittels der erfindungsgemäßen Plasmid-DNA-enhaltenden Liposomen

50 µg Plasmid-DNA wurden mit einem entsprechenden Anteil an lyophilisiertem Lipidgemisch versetzt, wobei das

Lipidgemisch in der unter Beispiel 1 erläuterten Weise hergestellt wurde. Unter intensivem Schütteln wurden Plasmid-DNA enthaltende humane Stratum corneum-Liposomen gebildet.

Nach entsprechender Vorbehandlung (Menk) bzw. Hydrierung des Stratum corneums mit Urea MENK (50 mM MOPS, 50 mM EDTA, 50 mM NaCl, 50 mM K_2PO_4) erfolgte die Applikation des oben genannten Plasmid-DNA-haltigen Liposomengemisches. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die entsprechenden Hautproben in ihre epidermalen und dermalen Anteile getrennt. Der epidermale Anteil wurde in einem quantitativen Test auf β -Galactosidase-Proteinaktivität untersucht. Nach Lyse der Lipidernis in Lysepuffer mit mechanischer Zerkleinerung wurden 2 ml des Zellextraktes mit Reaktionspuffer (0,035 mmol Galacton) Chemilumineszenz-Substrakt (Tropix Bedford, Massachusetts) gemischt. Nach der Inkubation für eine Stunde wurde Emerald Lumineszenzverstärker (Tropix Bedford, Massachusetts) hinzugegeben und die Chemilumineszenz in einem Chemiluminometer (z. B. Monolight 1005, Analytical Lumineszenz, San Diego, Californien) gemessen. Die β -Galactosidase-spezifische Aktivität in den epidermalen Extrakten wurde als Verhältnis der Lichteinheiten geteilt durch den Proteingehalt ermittelt. Die Negativkontrolle wurde durch nicht- β -Galactosidaseexprimierende Plasmide (z. B. Vektorkontroll-DNA) unter identischen Bedingungen erhalten. Jegliche Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt. Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in Fig. 6 für jede der Behandlungsgruppen dargestellt. Die absoluten Mengen an β -Galactosidase-Einzym kann ermittelt werden, indem die erhaltenen Werte der Lichteinheiten mit einer Eichkurve verglichen werden, die durch Hinzufügen bekannter Mengen an gereinigtem β -Galactosidaseenzym zu β -Galactosidase-negativen epidermalen Zellextrakten konstruiert wurde. Zusammenfassend zeigt sich, wie in Fig. 6 dargestellt, in Abhängigkeit entsprechend der Vorbehandlung eine hochsignifikante Steigerung der in der Epidermis hergestellten Menge an β -Galactosidase-Markerprotein.

Eine Steigerung der Transfektionseffizienz bzw. der Menge an erhaltenen Genprodukten ist im Rahmen der üblichen Fähigkeiten eines Fachmanns auf diesen Gebiet beispielsweise durch weitergehende Optimierung bzw. Vorbehandlung mit anderen Penetrationsverstärkern bzw. Zurverfügungstellung von geeigneten Nukleinsäurekonstrukten möglich.

Die in der vorstehenden Beschreibung sowie in den Ansprüchen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

Patentansprüche

1. Liposom umfassend eine eine Liposomenhülle ausbildende Lipidphase und eine von der Lipidphase umschlossene intraliposomale Phase, **dadurch gekennzeichnet**, daß die chemische Zusammensetzung der Lipidphase der einer Hautschicht entspricht und die intraliposomale Phase mindestens eine Verbindung enthält, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und niedermolekulare Verbindungen sowie aus diesen zusammengesetzte Moleküle oder Strukturen umfaßt.
 2. Liposom nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautschicht humane Epidermis ist.
 3. Liposom nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautschicht das Stratum corneum ist.
 4. Liposom umfassend eine eine Liposomenhülle ausbildende Lipidphase und eine von der Lipidphase umschlossene intraliposomale Phase, dadurch gekennzeichnet, daß das Liposom betreffend die Lipidklassen folgende Komponenten erfaßt:
- | | | |
|----------------------------------|------------|--|
| Phospholipide: | < 2 Gew.-% | |
| Cholesterolsulfat: | 2 Gew.-% | |
| Freie Fettsäuren: | 20 Gew.-% | |
| Ceramide: | 20 Gew.-% | |
| Sterole: | 43 Gew.-% | |
| Triacylglycerole (Neutralfette): | 4 Gew.-% | |
| Sterolester: | 9 Gew.-% | |

und die intraliposomale Phase mindestens eine Verbindung enthält, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und niedermolekulare Verbindungen sowie aus diesen zusammengesetzte Moleküle oder Strukturen umfaßt.

5. Verfahren zur Herstellung von Liposomen, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) Stratum corneum-Lipid gewonnen wird und
 - b) aus dem Stratum corneum-Lipid unter Ultraschallbehandlung und/oder Detergenzdialyse Liposomen hergestellt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Stratum corneum-Lipid gewonnen wird, indem Stratum corneum enzymatisch und/oder mechanisch von der Haut abgetragen wird und anschließend in Methanol-Chloroform extrahiert wird.
7. Liposom, herstellbar gemäß einem Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche.
8. Liposom nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß die intraliposomale Phase eine wäßrige Phase ist.
9. Liposom nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, die Wachstumsfaktoren, Antibiotika, schmerzlindernde Agenzien, Agenzien, die die Zellteilung und/oder die Vaskularisierung beeinflussen, koagulierende und anti-koagulierende Agenzien, Cytokine, chemisches Attraktants, Enzyme, und Kombinationen davon umfaßt.
10. Liposom nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung eine Nukleinsäuresequenz ist.
11. Verfahren zur Transfektion von Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß die zu transfizierenden Zellen mit einem Liposom gemäß einem der vorangehenden Ansprüche in Kontakt gebracht werden.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die zu transfizierenden Zellen Hautzellen sind.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautzellen ausgewählt sind aus der Gruppe, die Hautzellen des Stratum corneum, Stratum granulosum und Stratum spinosum sowie Keratinozyten umfaßt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-13, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Keratinozyten der Haarfollikel sind.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-13, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen epidermale Langerhans-Zellen sind.
16. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche sowie einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.
17. Mittel zur topischen Verabreichung, gekennzeichnet durch einen Gehalt an Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche.
18. Mittel nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe, die Cremes, Salben, Gele, Sprühverbände und Tinkturen umfaßt.
19. Mittel nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin einen Gehalt an mindestens einer Verbindung aufweist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Permeabilitätsverstärker und Quellmittel umfaßt.
20. Verwendung der Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche, der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Mittels nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Gentherapie von Hautzellen.
21. Verwendung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautzellen in situ vorliegen.
22. Verwendung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautzellen ex vivo vorliegen.
23. Verwendung nach einem der Ansprüche 20-22, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautzellen ausgewählt sind aus der Gruppe, die Hautzellen des Stratum corneum, Stratum granulosum und Stratum spinosum sowie Keratinozyten umfaßt.
24. Verwendung nach einem der Ansprüche 20-23, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautzellen Keratinozyten der Haarfollikel sind.
25. Verwendung nach einem der Ansprüche 20-24, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautzellen epidermale Langerhans-Zellen sind.
26. Verwendung der Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche, der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Mittels nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Erkrankungen der Haut.
27. Verwendung nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die genetische Hauterkrankungen, Psoriasis, Hauttumoren und Wunden umfaßt.
28. Verwendung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die genetische Hauterkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die Epidermolysis bullosa simplex, Epidermolysis hyperkeratosis, palmoplantare Keratose, junctionale Epidermolysis bullosa, dystrophie Epidermolysis bullosa, lamellare Ichthyose und Xeroderma pigmentosum umfaßt.
29. Verwendung der Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche, der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Mittels nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Behandlung von Warzen.
30. Verwendung der Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche, der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Mittels nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Behandlung systemischer Erkrankungen.
31. Verwendung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die systemische Erkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die Hamophilie A und Hamophilie B sowie Kollagendegenerationen umfaßt.
32. Verwendung der Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche, der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Mittels nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Behandlung von Alopezie.
33. Verwendung der Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche, der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Mittels nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Immunisierung eines Wirtsorganismus.
34. Verwendung nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirtsorganismus ein menschlicher Organismus ist.
35. Impfstoff, dadurch gekennzeichnet, daß der Impfstoff einen Gehalt an Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche aufweist, wobei die Liposomen Nukleinsäure, die die genetische Information für ein interessierendes Antigen umfaßt, oder Nukleinsäure umfassen, die die genetische Information für einen Antikörper oder ein Antikörperfragment umfaßt, wobei der Antikörper bzw. das Antikörperfragment spezifisch für das interessierende Antigen ist.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Fig. 1

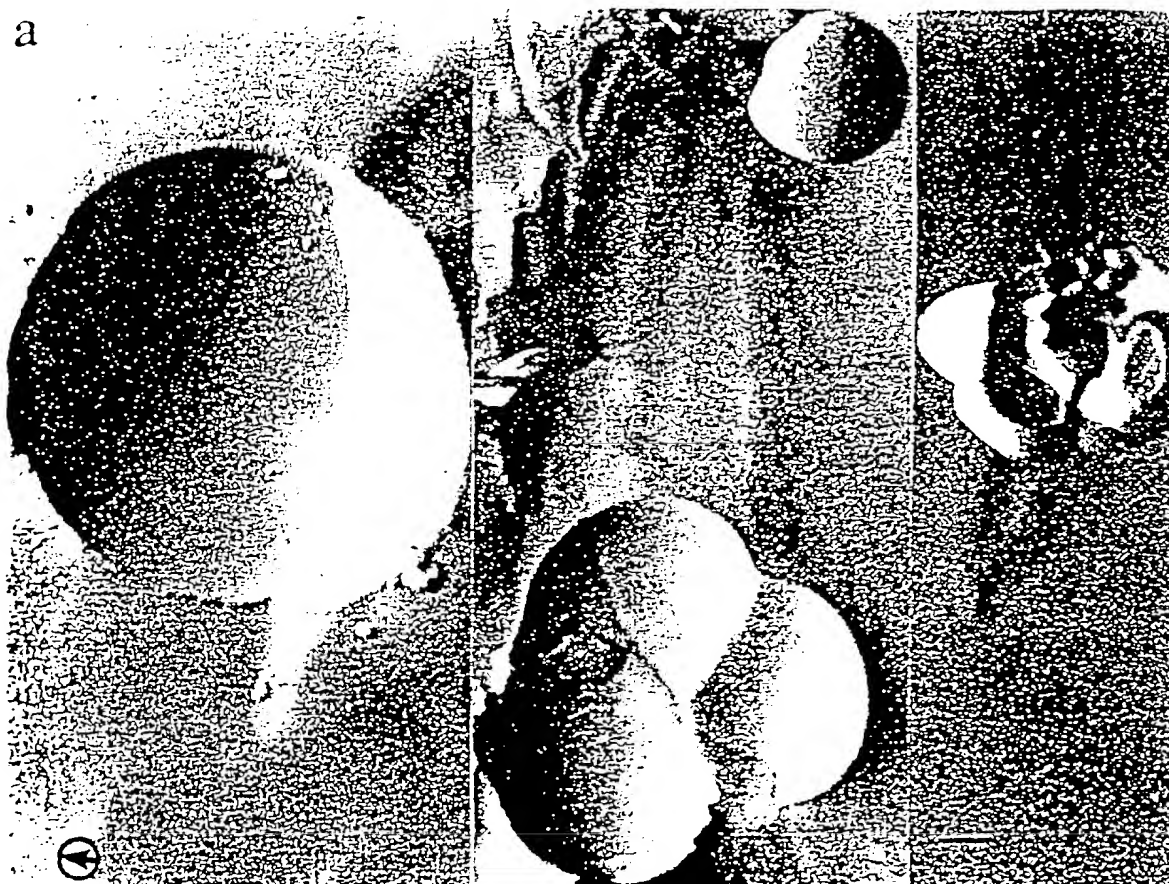


Fig. 2

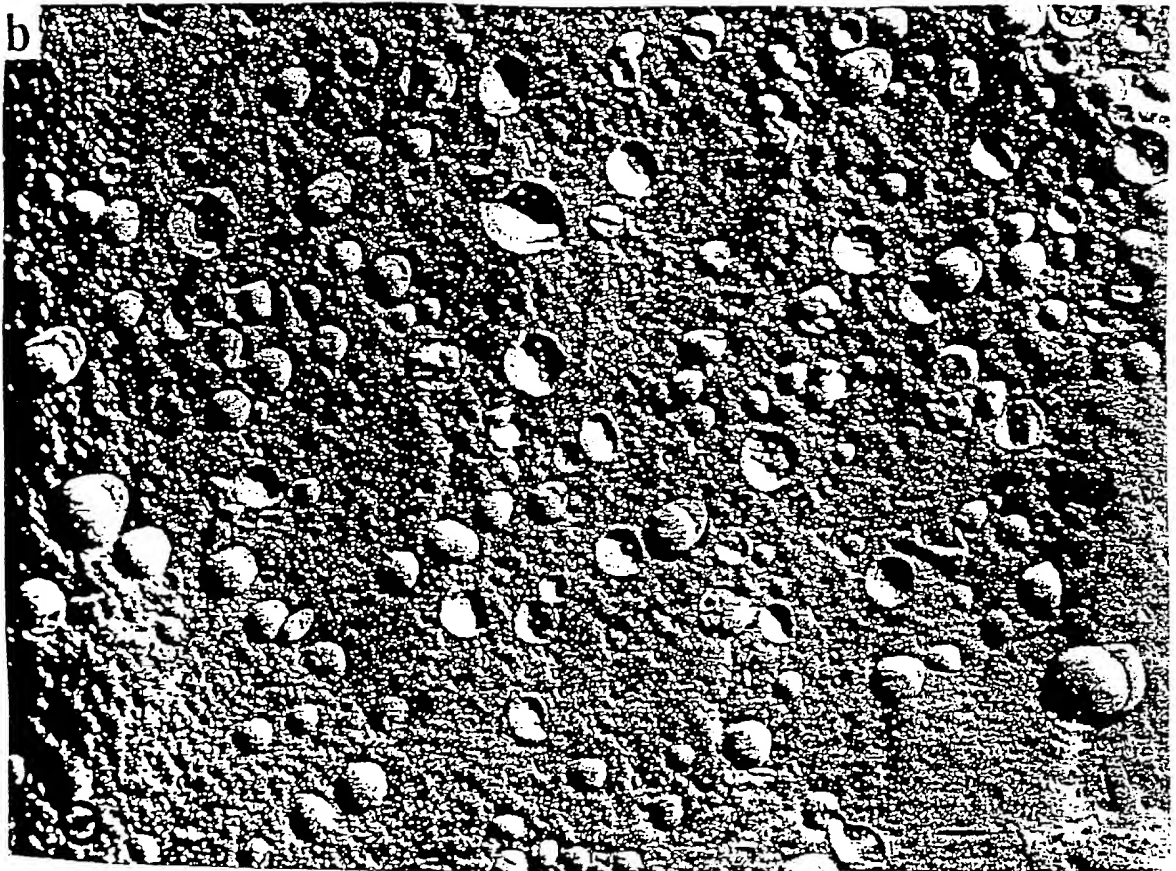


Fig. 3

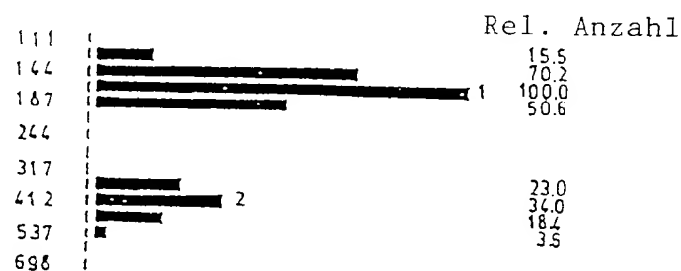
 Größe in Nanometer
 (logarithmische Skalierung)


Fig. 4

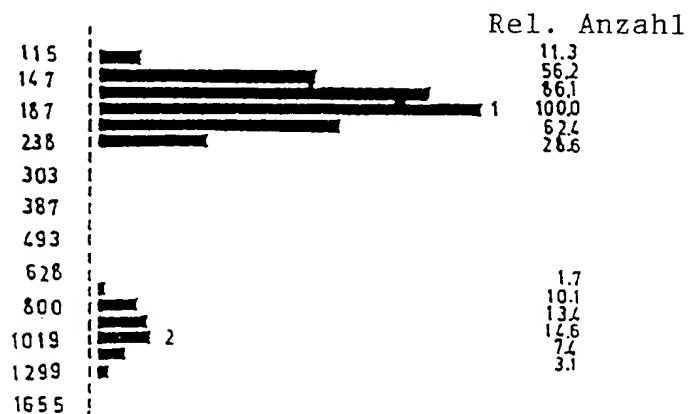
 Größe in Nanometer
 (logarithmische Skalierung)


Fig. 5

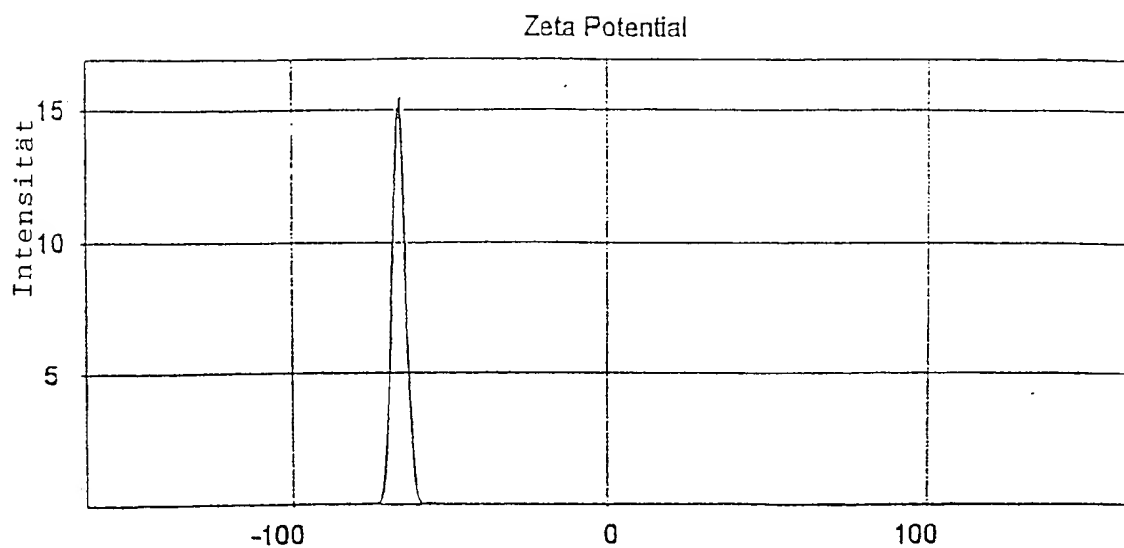


Fig. 6

Transfektion von Menschenhaut mit einer
liposomalen Plasmid-Lösung:
pCMV-βGal/hSCCLs (50μg/156μg)

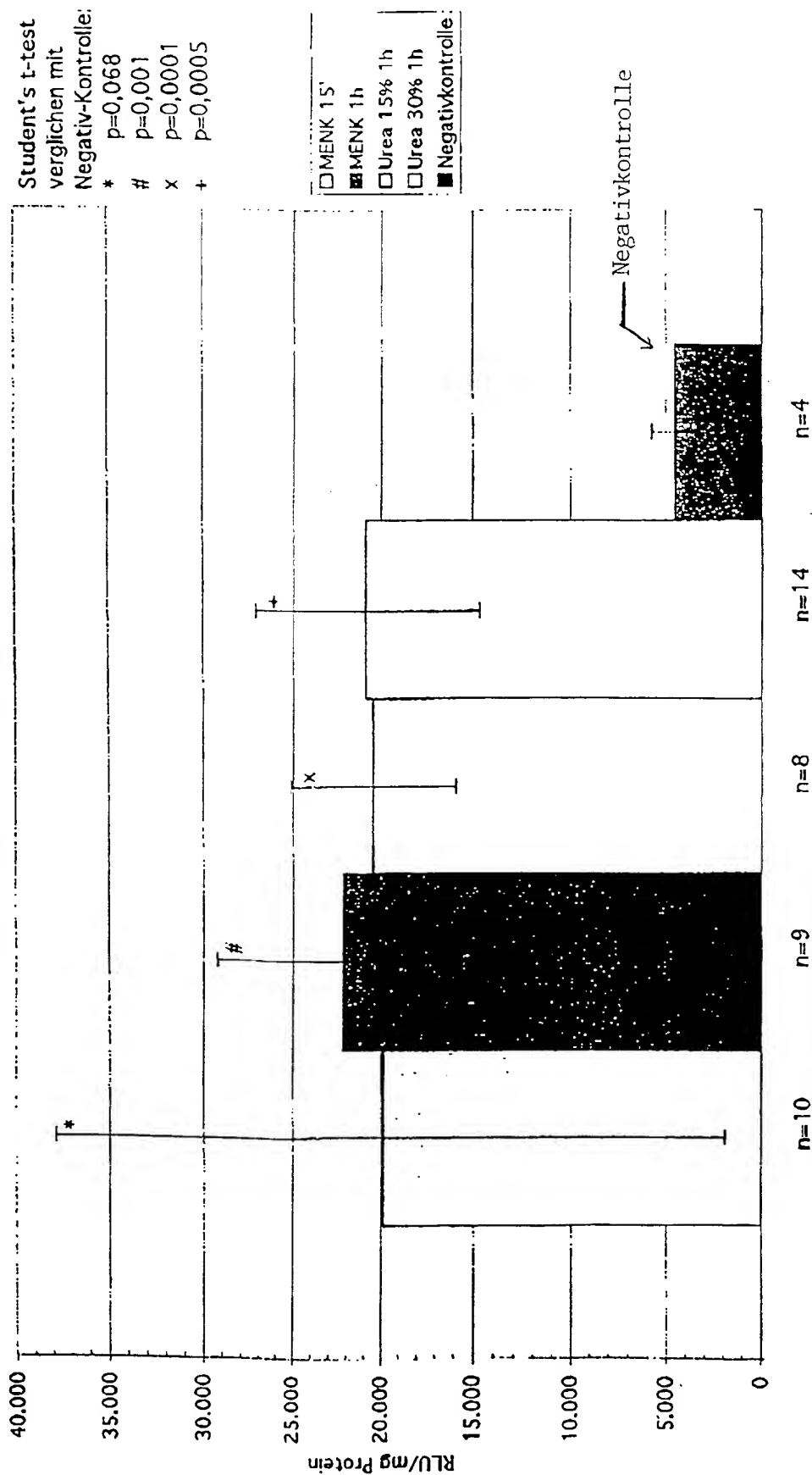


Fig. 1

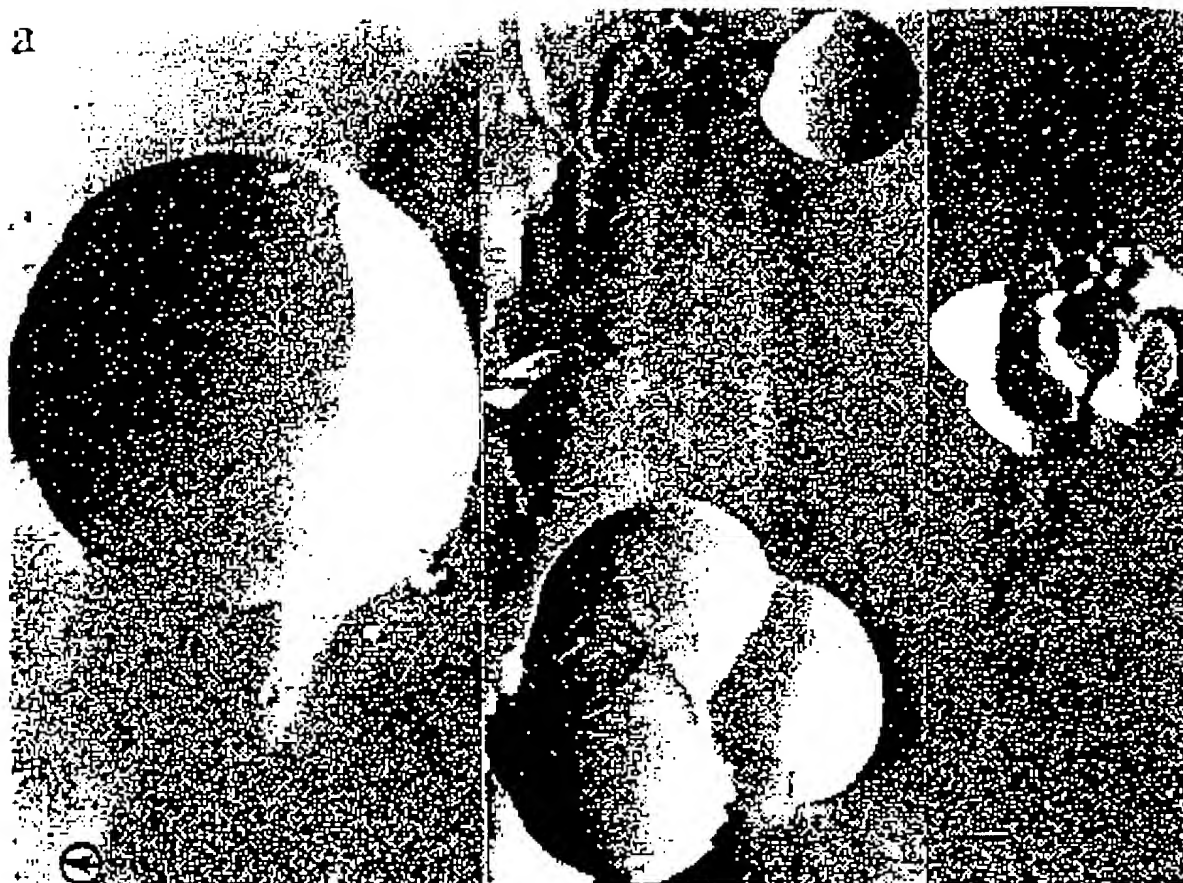


Fig. 2

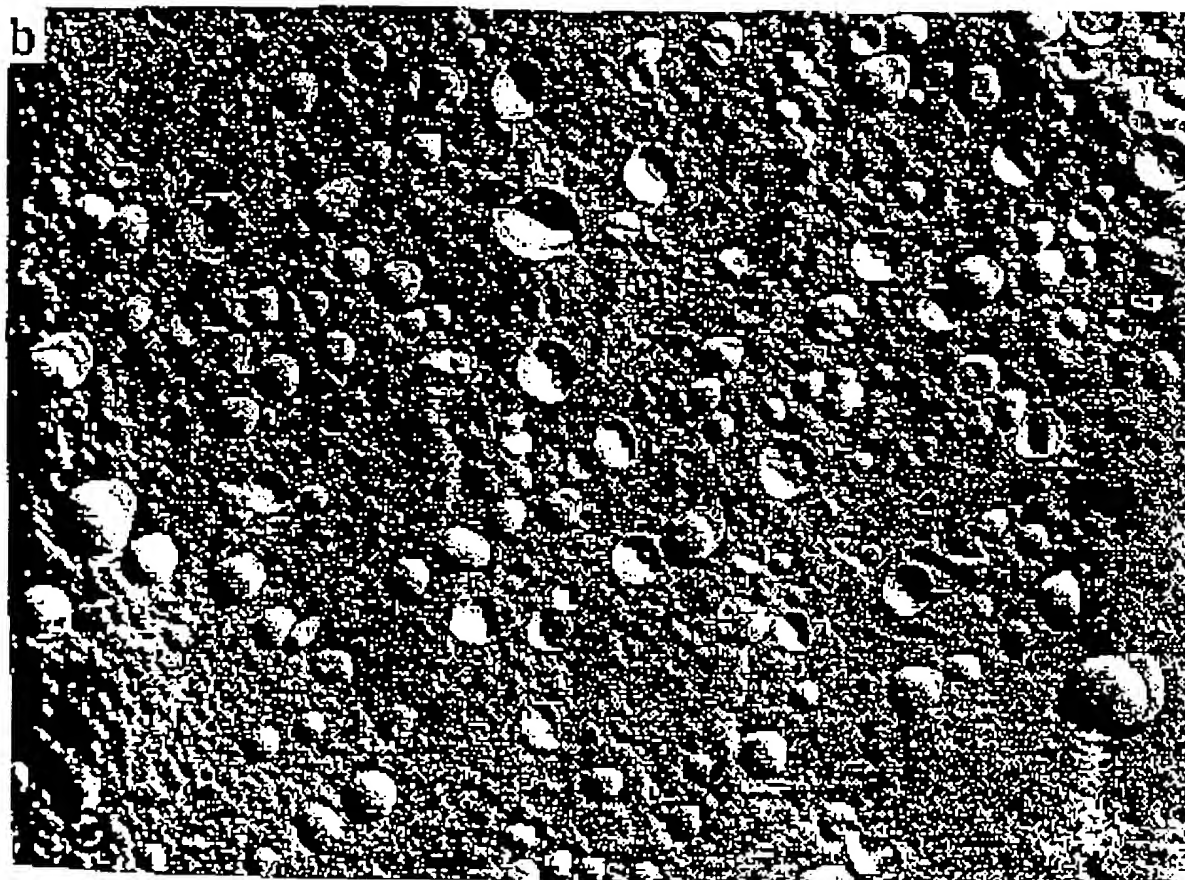


Fig. 3

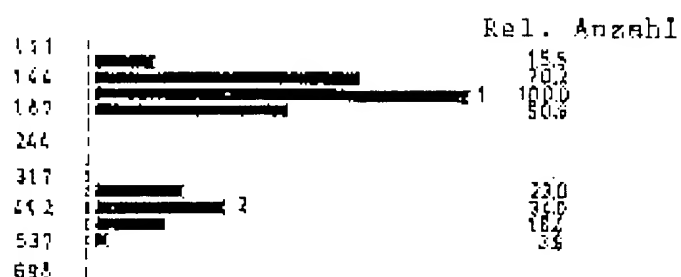
Größe in Nanometer
(logarithmische Skalierung)

Fig. 4

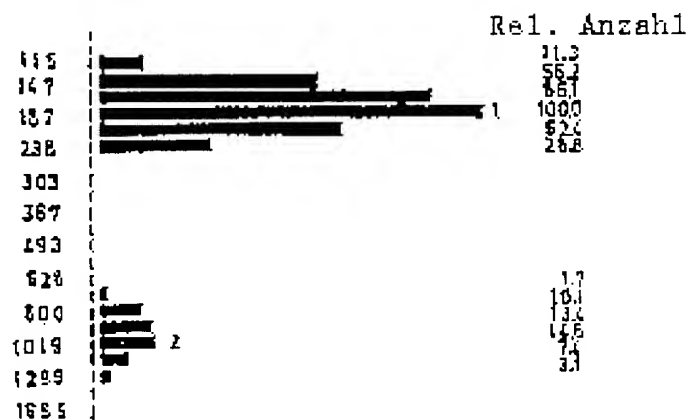
Größe in Nanometer
(logarithmische Skalierung)

Fig. 5

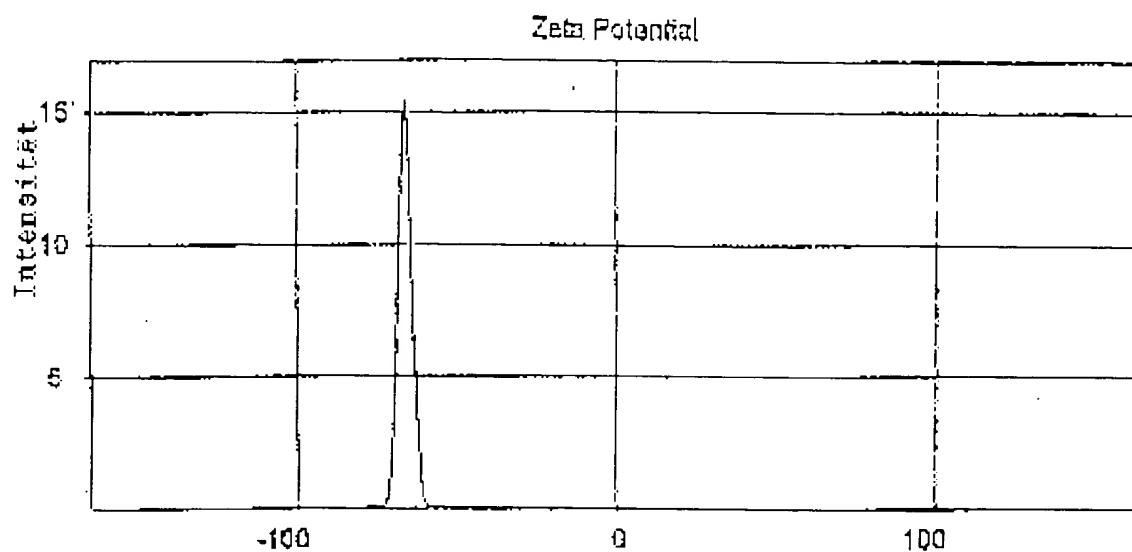


Fig. 6

Transfektion von Menschenhaut mit einer
apoptomalen Plasmid-Lösung:
pCMV-EGFP/hSCCLs (50µg/156µg)

